

**U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663****Generel information****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 er en genomredigeret human osteosarkomcellelinje afledt af U2OS-celler, hvor det endogene RANBP2-lokus (også kendt som NUP358) er blevet modificeret ved hjælp af CRISPR/Cas9 til at kode for et SNAPf-tag i rammen med det oprindelige protein. Nup358/RanBP2 er et stort nukleoporin, der er lokaliseret i cytoplasmatiske filamenter i nuklearporekomplekset (NPC) og spiller en afgørende rolle i nukleocytoplasmatiske transport, SUMOylering og mitotiske processer. Endogen mærkning sikrer, at SNAPf-Nup358 udtrykkes under fysiologisk promotorkontrol, hvilket opretholder native ekspressionsniveauer og minimerer artefakter forbundet med overekspressionssystemer.

SNAPf-tagget er en hurtigt mærkende variant af SNAP-tagget, der kovalent binder benzylguanin-konjugerede substrater, hvilket muliggør selektiv og stabil fluorescerende mærkning af Nup358 i levende eller fiksede celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler lokaliseres fusionsproteinet til kernehinden i en punktformet fordeling, der er karakteristisk for cytoplasmatiske NPC-filamenter. Denne konfiguration understøtter højopløsningsfluorescensbilleddannelse, superopløsningsmikroskopi, puls-chase-mærkning og enkeltmolekylsporing til at studere NPC-arkitektur og -dynamik. Den flade morfologi og de store kerner i U2OS-celler letter yderligere kvantitativ billeddannelse af kernemembranstrukturer.

Denne model muliggør undersøgelse af Nup358-specifikke roller i CRM1/exportin-afhængig nuklear eksport, Ran GTPase-cyklusregulering og den rumlige organisering af cytoplasmatiske transportplatforme. I betragtning af Nup358's involvering i mitotisk spindelmontering og kinetokorfunktion er cellelinjen også velegnet til at studere cellecycklusafhængig omfordeling af nukleoporiner og NPC-adskillelse/genmontering under mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 udgør en fysiologisk relevant platform til at analysere strukturelle og funktionelle aspekter af den cytoplasmatiske side af kerneporekomplekset i humane celler.

**Organism** Menneske**Tissue** Knogle**Disease** Osteosarkom**Karakteristika****Age** 15 år**Gender** Kvinde**Ethnicity** Kaukasisk**Morphology** Epitel-lignende**Growth properties** Vedhæftende

**U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663****Regulatoriske data**

<b>Citation</b>	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalognummer 300663)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>Depositor</b>	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinje (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) indeholder en CRISPR-konstrueret SNAPf-Nup358/RanBP2-fusion, der muliggør præcis mærkning af cytoplasmatiske fibriller i nukleare porer. Modifikationen er stabilt integreret. Denne klassificering gælder kun i Tyskland og kan variere andre steder.

**Biomolekylære data**

<b>Protein expression</b>	Nup358/RanBP2, SNAPf-tag
---------------------------	--------------------------

**Håndtering**

<b>Culture Medium</b>	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukose, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> (Cytion artikelnummer 820200a)
<b>Supplements</b>	Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1 % NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspend cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.
<b>Freeze medium</b>	Som kryopræservesmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmoteskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryoinduceret stress.

**U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663****Thawing and  
Culturing Cells**

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved  $300 \times g$  i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

**Incubation  
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , befugtet atmosfære.

**Flask Coating**

Ingen

**Freezing  
Procedure**

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca.  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

**Shipping  
Conditions**

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca.  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

## U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663

### Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

## Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

### Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.